

氏 名	中里 亮太
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	甲第10号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	脳内ミクログリアに発現する転写制御因子に関する分子薬理学的研究
論 文 審 査 委 員	主査 米田 幸雄
	副査 善岡 克次
	副査 加藤 将夫
	副査 中道 範隆
	副査 檜井 栄一

学位論文要旨

Runx2-related transcription factor-2 (Runx2) is the master regulator of both osteogenesis and chondrogenesis. In this study, we investigated the possible expression of Runx2 by microglia, which are known to be derived from the macrophage lineage. Both *Runx2* and Runx2 were constitutively expressed in cultured murine microglia and microglial BV-2 cells, together with co-localization of immunoreactive Runx2 with a microglial marker protein in murine cortical and hippocampal sections. Exposure to 1 mM ATP led to a significant but transient increase in Runx2 expression, while both phagocytosis and chemotaxis were promoted in association with upregulation of the expression of microglia-related genes in BV-2 cells overexpressing Runx2. These results suggest that Runx2 is constitutively expressed to play a role in the regulation of different functions in microglial cells.

【緒言】 中枢神経系は神経細胞とそれを取り巻く多数のグリア細胞から構成されている。そのグリア細胞 1 つであるミクログリア細胞は、脳内マクロファージとも呼ばれ、中枢の免疫担当細胞として知られているが、一方でさまざまな中枢疾患において活性化し、病巣部への移動（走化性）、異物の除去（貪食・飽食作用）、液性因子の放出などの作用を示すことで、病態発症や症状の進行に関与していることが明らかとなっている。そのため、近年では中枢疾患の新たな治療薬のターゲットとして注目が集まっている。しかしながら、これらの機能発現メカニズムは徐々にわかりつつあるものの、それらを制御する転写因子の報告は非常に少ない。ミクログリア細胞の活性化および機能を制御する転写因子の解明は、ミクログリア細胞の機能解明のみならず、様々な中枢疾患治療薬の重要なターゲットとなりうる。一方、我々の研究室ではこれまで、中枢神経系の興奮性情報伝達物質であるグルタミン酸や D-セリン、GABA などが、骨組織を構成する細胞においても、シグナル分子として機能していることを多数報告してきた。これらの研究成果から、「骨」と「中枢」が共通の恒常性メカニズムを持つことが示唆され、中枢神経系においても骨制御因子が機能している可能性が考えられるそこで本研究では、骨関節系組織の細胞で重要な転写因子として報告のある**骨制御因子 Runt-related transcription factor-2 (Runx2)**に着目し解析を行った。

【背景】 骨格の支持や伸長を担う末梢組織である骨関節組織においては、骨形成を担う骨芽細胞や骨吸収を担う破骨細胞、そして関節の支持を担う軟骨細胞などといった各種骨関節系細胞が存在する。骨組織は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返し、再構築（リモデリング）を営むことにより形態や機能を維持している。このリモデリング過程を調節する代表的な骨制御因子として **Runt-related transcription factor-2 (Runx2)**が知られている。Runx2 は、骨芽細胞や軟骨細胞の分化過程を制御し、骨の形成に必須の転写因子として知られている。実際に、Runx2 欠損マウスでは骨の形成が全く認められず、生後間もなく死亡してしまうことから、骨のマスターレギュレーターであると考えられている。一方で、近年では骨だけでなくがん細胞や、樹状細胞、さらには脳の神経細胞にも機能的に発現するという報告が存在する。しかしながら、中枢神経系を構成するミクログリア細胞における Runx2 に関しては研究が

行われていない。そこで、本研究では中枢の免疫担当細胞であるミクログリア細胞における Runx2 の機能的発現の可能性について検討を行った。

[方法] Runx2 の発現解析；マウス脳の凍結切片を作製し、免疫蛍光染色によりミクログリア細胞における Runx2 の発現について検討した。**各種薬物長時間刺激によるミクログリア活性化時の Runx2 発現解析**；BV-2 細胞に各種薬物を曝露し、Runx2 の発現変化を RT-PCR 法により検討した。**ATP 受容体アンタゴニストおよびアゴニストを用いた Runx2 の発現解析**；BV-2 細胞に P2 受容体の非選択的アンタゴニスト PPADS、P2X 受容体の非選択的アンタゴニスト isoPPADS、および P2X₇受容体選択的アンタゴニスト oxATP を前処置し、ATP 曝露した細胞の total RNA を回収後、RT-PCR 法により Runx2 の発現量について検討した。また P2X₇受容体選択的アゴニスト BzATP 曝露による Runx2 の発現についても同様に検討した。**細胞内シグナル分子に対する各種阻害剤の Runx2 発現への影響**；BV-2 細胞に各種阻害剤を前処置し、長期間 ATP 曝露時における Runx2 mRNA の発現量について検討した。**BV-2 細胞への Runx2 siRNA 導入による解析**；siRunx2 を導入した BV-2 細胞に 1 mM ATP を曝露し、Time lapse 解析により細胞形態変化観察した。さらに PI/Hoechst 染色および MTT 還元活性の測定により細胞死への影響について検討した。**BV-2 細胞への短時間薬物曝露による Runx2 の発現解析**；各種薬物を 30 min 間だけ曝露し、培養メディアを交換後、さらに各時間培養し、Runx2 の発現を検討した。**発現ベクター導入による Runx2 過剰発現 BV-2 細胞での機能解析**；Runx2 発現ベクターを導入した BV-2 細胞を用いて、real time PCR 法により各種ミクログリア関連遺伝子の mRNA 発現を検討するとともに、食食・飽食能の指標となる蛍光ビーズの取り込み能をフローサイトメトリーにより測定した。さらに Tranwell を用いた走化能についての検討を行った。**BV-2 細胞への Runx2 shRNA 導入による解析**；shRunx2 を導入した BV-2 細胞を用いて、real time PCR 法により、骨において Runx2 の制御下にあることが知られており、ミクログリア細胞での機能的発現が報告されている *Mmp13*、*Spp1*、および *Vegf* の mRNA 発現を検討した。**Runx2 コンディショナルノックアウトマウスの作製**；Cre/loxP システムを利用し、ミクログリアやマクロファージに特異的に Cre recombinase を発現する *Lyz2*-cre マウスと Exon4 を含む遺伝子領域を loxP で挟んだ mutant allele を持つ *Runx2^{fllox/+}* マウスを交配させることで、細胞特異的 Runx2 ノックアウトマウス (*Runx2^{Lyz2^{-/-}}* マウス) を作製し、ミクログリア細胞の活性化が病態の発症に大きく関与する神経障害性疼痛モデルを適用し、痛みの評価を行った。

[結果] Runx2 の発現解析；マウス大脳皮質および海馬においてミクログリア細胞のマーカーである *Iba1* と Runx2 の両陽性細胞が観察された。**各種薬物長時間刺激によるミクログリア活性化時の Runx2 発現解析**；BV-2 細胞に 1 mM ATP を曝露したところ、Runx2 mRNA およびタンパク質の一過的な発現上昇が観察された。**ATP 受容体アンタゴニストおよびアゴニストを用いた Runx2 の発現解析**；BV-2 細胞において、1 mM PPADS、1 mM isoPPADS および 100 μ M oxATP を前処置したところ、1 mM ATP 曝露による Runx2 mRNA の発現上昇が有意に抑制された。また、300 μ M BzATP を曝露により 1 mM ATP 曝露と同程度の Runx2 mRNA の発現上昇が観察された。**細胞内シグナル分子に対する各種阻害剤の Runx2 発現への影響**；BV-2 細胞にカルシニューリンの阻害剤であるシクロスポリン A や FK506 を前処置することで、長期 ATP 曝露による Runx2 の発現上昇が有意に抑制された。**BV-2 細胞への Runx2 siRNA 導入による解析**；siRunx2 導入により、ATP 刺激においてラミファイド様の細胞形態をとる細胞の割合が減少した。

ATP の長時間刺激により PI/Hoechst 細胞の割合の著明な増加や MTT 還元活性の低下が認められ、これは siRunx2 の導入でも特に変化は認められなかった。BV-2 細胞への短時間薬物曝露による Runx2 の発現解析；短時間 ATP 刺激においては細胞死の誘発は認められなかったが、Runx2 の著明な発現上昇が認められ、その発現上昇は oxATP により有意に抑制された。しかしながら、シクロスポリン A や FK506 の前処置では Runx2 の発現上昇は抑制されなかった。発現ベクター導入による Runx2 過剰発現 BV-2 細胞での機能解析；Runx2 過剰発現 BV-2 細胞では、*Mmp13* に加え、ケモカイン受容体である *Cx3cr1*、*Ccr2* や、炎症性サイトカインである *Tnfa* mRNA の発現量が有意に増加した。さらに、Runx2 過剰発現 BV-2 細胞では、蛍光ビーズを取り込む細胞の割合が有意に増加し、さらに Transwell において、走化因子 M-CSF により移動した細胞数の増加傾向が観察された。BV-2 細胞への Runx2 shRNA 導入による解析；*shRunx2* 導入により Runx2 をノックダウンした BV-2 細胞では、短時間 1 mM ATP 曝露により上昇した *Mmp13* mRNA 発現が有意に抑制された。Runx2 コンディショナルノックアウトマウスの作製；Control マウスでは神経傷害による痛みの過敏化が認められたのに対し、*Runx2^{Ly2}* マウスでは痛みの過敏化が有意に抑制された。さらに、脊髄後角で認められるミクログリア細胞数の増加も有意に抑制された。

[結論] 以上の結果より、ミクログリア細胞に発現する Runx2 は細胞外高濃度 ATP により活性化した P2X₇ 受容体を介して発現が上昇する。しかしながら、ATP の曝露時間により Runx2 の発現上昇メカニズムやその機能は異なることが示唆された。さらにミクログリア細胞に発現する Runx2 に関しても転写因子として *Mmp13* などの各種遺伝子発現を制御することで、食食能や走化性、サイトカインの放出などのミクログリアの機能を制御する可能性が示唆された(Fig.1)。さらに、実際の生体内ではミクログリア細胞による神経障害性疼痛発症メカニズムに Runx2 が関与する可能性が示唆された。よって、ミクログリアに発現する Runx2 はミクログリア活性化において重要な転写制御因子である可能性が考えられる。

[考察] 本研究結果より、ミクログリア細胞機能を制御する新たな転写因子の役割が明らかとなった。Runx2 が高濃度 ATP により発現が一過的に上昇し、ミクログリア細胞の機能を遺伝子発現制御によりコントロールする可能性を示した本研究は、病態時における神経細胞死などにより引き起こされる、細胞外 ATP 濃度の上昇によるミクログリア細胞の活性化制御機構のさらなる解明につながると考えられる。さらに、ATP の曝露時間によるミクログリア細胞の機能変化に Runx2 の関与が示唆され、ミクログリア細胞活性化の神経傷害性と神経保護性の相反する 2 つの性質の制御機構の解明に新たな知見をもたらしたと考えられる。今後は *in vivo* でのミクログリア細胞における Runx2 の役割についてより詳細な解析を行っていく必要がある。本研究は、ミクログリア細胞研究における新たな視点から展開されたものであり、これらの解析が今後のミクログリア細胞をターゲットとした様々な中枢疾患に対する治療法や治療薬の開発に新たな展望をもたらすことを期待したい。

審査結果の要旨

本研究では、骨と脳の恒常性維持メカニズムの類似性を解明する目的で、骨形成の主要制御因子である **Runx2** の脳内ミクログリア細胞における機能的発現の可能性を探索した。成熟マウス脳内の大脳皮質や海馬では、ミクログリア細胞マーカー**Iba1** 陽性細胞に一致して、抗 **Runx2** 抗体陽性が検出された。マウスミクログリア細胞株 **BV-2** 細胞には **Runx2** の mRNA とタンパク質の恒常的発現が確認されたが、ミクログリア細胞の活性化作用を持つ化合物の中で、高濃度 ATP のみが一過性に **BV-2** 細胞における **Runx2** の mRNA とタンパク質の発現上昇を誘発した。同様の恒常的な **Runx2** 発現と一過性 ATP 応答性が、マウス脳初代培養ミクログリア細胞にも確認された。**BV-2** 細胞への ATP 曝露は、さらに **Runx2** 下流遺伝子である *Mmp13* 発現を上昇させたが、**Runx2** 発現ベクターや *shRunx2* 導入実験の結果、骨芽細胞の場合と同様に *Mmp13* が **Runx2** に高い応答性を示すことが明らかとなった。**Runx2** 過剰発現 **BV-2** 細胞では、*Mmp13* 以外にケモカイン受容体の *Cx3cr1* と *Ccr2* および炎症性サイトカインの *Tnfα* の発現上昇とともに、細胞の貪食能と走化能の亢進が観察された。以上の研究成績は、脳内ミクログリア細胞の未知なる機能解明研究に手掛かりを与えると同時に、同細胞が関与する中枢神経系疾患の予防と治療戦略展開への応用が期待される点で高く評価されるので、審査委員会は本論文が博士（創薬科学）に値すると判断した。